



91012
06/28/95

PATENT
2185-226P

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Satoshi MORI et al.
Applic. No.: 09/026,400 Group No.: Unassigned
Filed: February 19, 1998 Examiner: Unassigned
For: NICOTIANAMINE AMINOTRANSFERASE AND GENE THEREFOR

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

April 20, 1998

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

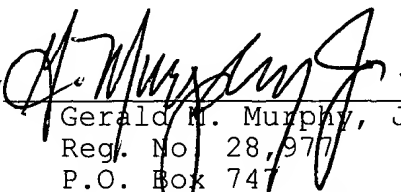
<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
Japan	9-037499	February 21, 1997

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By 
Gerald M. Murphy, Jr.
Reg. No. 28,977
P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

Attachment
(Rev. 12/4/97)



日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

703-205-5000
2085-226 P SP
Satoshi MORI et al
09/026,400 #9
attach
100)

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1997年 2月21日

出願番号

Application Number:

平成 9年特許願第037499号

出願人

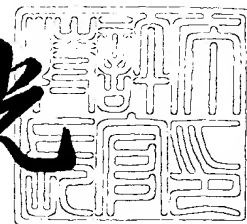
Applicant (s):

住友化学工業株式会社

1998年 2月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平10-3010360

【書類名】 特許願

【整理番号】 P147972

【提出日】 平成 9年 2月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/12
C12N 15/29

【発明の名称】 ニコチアナミンアミノ基転移酵素、その遺伝子およびその利用

【請求項の数】 20

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県習志野市谷津6丁目7番2-301号

 【氏名】 森 敏

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都文京区千駄木5丁目32番20号 第3本郷荘

 【氏名】 中西 啓仁

【発明者】

 【住所又は居所】 栃木県宇都宮市宝木町1丁目2582番地11

 【氏名】 高橋 美智子

【特許出願人】

 【識別番号】 000002093

 【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

 【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

 【識別番号】 100093285

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 久保山 隆

 【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

 【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9004612

【包括委任状番号】 9203867

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ニコチアナミンアミノ基転移酵素、その遺伝子およびその利用

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有することを特徴とするタンパク質。

【請求項2】

請求項1記載のタンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子。

【請求項3】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とする請求項2記載の遺伝子。

【請求項4】

配列番号2で示される塩基配列(CDSの存在位置62～1444)を有することを特徴とする請求項3記載の遺伝子。

【請求項5】

請求項2記載の遺伝子を含有することを特徴とするプラスミド。

【請求項6】

請求項5記載のプラスミドが宿主細胞内に導入されてなることを特徴とする形質転換体。

【請求項7】

宿主細胞が微生物であることを特徴とする請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】

宿主細胞が植物であることを特徴とする請求項6記載の形質転換体。

【請求項9】

(1)植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2)請求項2記載の遺伝子及び(3)植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させることを特徴とする発現プラスミドの構築方法。

【請求項10】

(1)植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2)請求項2記載の遺伝子及び(3)植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミド。

【請求項11】

(1)宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2)ニコチアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子及び(3)宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなる発現プラスミドを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を形質転換させることにより形質転換体の鉄吸収能力を増強することを特徴とする方法。

【請求項12】

宿主細胞が植物であることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】

発現プラスミドが請求項10記載の発現プラスミドであることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項14】

請求項2、3又は4記載の遺伝子の部分塩基配列を有することを特徴とする遺伝子断片。

【請求項15】

塩基数が15以上50以下であることを特徴とする請求項14記載の遺伝子断片。

【請求項16】

配列番号3に示される塩基配列を有することを特徴とする請求項14記載の遺伝子断片。

【請求項17】

請求項14、15又は16記載の遺伝子断片をプローブとして用いて、植物遺伝子断片からハイブリダイゼーション法によってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出することを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子の検出法。

【請求項18】

請求項14、15又は16記載の遺伝子断片をプライマーとして用いて、植物遺伝子断片に対してPCR(Polymerase chain reaction)を行うことによってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を増幅させることを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子の増幅方法。

【請求項19】

請求項17又は18記載の方法によりニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子の取得方法。

【請求項20】

請求項17又は18記載の方法によりニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することにより取得されることを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ニコチアナミンアミノ基転移酵素、該遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

乾燥地塩類集積土壌の1つである石灰質土壌は、中国、中近東諸国、アフリカ中北部、アメリカ中西部など、世界の土壌の30%を占めている。この土壌では、高pHのために土壌中の鉄が不溶化しており、この不溶態の鉄を何らかの形で可溶化し根から吸収利用できなければ、植物は鉄欠乏によるクロロシスを呈してこの土壌では生育できない。これらの地域での農業および環境緑化を考えた場合、土壌中の可溶性鉄欠乏に対する対策が重要な課題となる。

植物の鉄欠乏を農業技術的に解決するには、(1)イオウを投与してアルカリ土壌のpHを中性から微酸性に矯正すること、(2)キレート性の鉄を含む物を施用すること、(3)有機物を投与すること等によって土壌微生物活性を高め、微生物のシデロフォア(鉄輸送体)生産量を増やし、土壌中の可溶性の鉄を増大させる方法が考えられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、これらの土壌処理による鉄の供給方法では、例えば、大量の施用資材が必要となること、生育時期、投与部位、濃度、展着剤の種類などの投与方法や気象条件によって、その効果は極めて不安定であること等の問題点があり、必ずしも満足できるものではない。そこで新たな技術の開発が切望されていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

このような状況下で、本発明者らは鋭意検討を行った結果、土壌中の不溶化鉄の吸収能力を増強し、鉄欠乏耐性を向上させるのに適する新規な遺伝子を見出し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

- 1)配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有することを特徴とするタンパク質(以下、本発明タンパク質と記す)、
- 2)前項1記載のタンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子(以下、本発明遺伝子と記す。)、
- 3)配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有することを特徴とする前項2記載の遺伝子、
- 4)配列番号2で示される塩基配列(CDSの存在位置62～1444)を有することを特徴とする前項3記載の遺伝子、
- 5)前項2記載の遺伝子を含有することを特徴とするプラスミド(以下、本発明プラスミドと記す。)、

- 6)前項5記載のプラスミドが宿主細胞内に導入されてなることを特徴とする形質転換体(以下、本発明形質転換体と記す。)、
- 7)宿主細胞が微生物であることを特徴とする前項6記載の形質転換体、
- 8)宿主細胞が植物であることを特徴とする前項6記載の形質転換体、
- 9)(1)植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2)前項2記載の遺伝子及び(3)植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させることを特徴とする発現プラスミドの構築方法(以下、本発明構築方法と記す。)、
- 10)(1)植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2)前項2記載の遺伝子及び(3)植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなることを特徴とする発現プラスミド(以下、本発明発現プラスミドと記す。)、
- 11)(1)宿主細胞内で機能可能なプロモーター、(2)ニコチアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子及び(3)宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させてなる発現プラスミドを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を形質転換させることにより形質転換体の鉄吸収能力を増強することを特徴とする方法(以下、本発明鉄吸収能力増強方法と記す。)、
- 12)宿主細胞が植物であることを特徴とする前項11記載の方法。
- 13)発現プラスミドが前項10記載の発現プラスミドであることを特徴とする前項11記載の方法、
- 14)前項2、3又は4記載の遺伝子の部分塩基配列を有することを特徴とする遺伝子断片(以下、本発明遺伝子断片と記す。)、
- 15)塩基数が15以上50以下であることを特徴とする前項14記載の遺伝子断片、
- 16)配列番号3に示される塩基配列を有することを特徴とする前項14記載の遺伝子断片、
- 17)前項14、15又は16記載の遺伝子断片をプローブとして用いて、植物遺伝子断片からハイブリダイゼーション法によってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出することを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素の検出法(以下、本発明検出方法と記す。)、
- 18)前項14、15又は16記載の遺伝子断片をプライマーとして用いて、植物遺伝子

断片に対してPCR(Polymerase chain reaction)を行うことによってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を増幅させることを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子の増幅方法(以下、本発明増幅方法と記す。)、

19)前項17又は18記載の方法によりニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子の取得方法、

20)前項17又は18記載の方法によりニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することにより取得されることを特徴とするニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子、

を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、さらに詳細に本発明を説明する。

本発明タンパク質は、配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有することを特徴とするタンパク質であり、例えば、オオムギ(*Hordeum vulgare*)などのイネ科植物から、例えば、後述の方法で調製することができる。成熟タンパク質の分子量は47KDaであり、そのアミノ酸は429個からなる。

ここで、ニコチアナミンアミノ基転移酵素活性とは、2-オキシグルタミン酸由来のアミノ基をニコチアナミンに転移する能力を意味する。

本発明タンパク質が触媒する反応と引き続いて起こる還元反応によって生成するデオキシムギネ酸、さらに水酸化反応を経て生成するムギネ酸や3'-ヒドロキシムギネ酸などのムギネ酸類縁化合物は、土壌中の不溶化鉄とキレート錯体を形成することによって鉄を可溶化させる。ある種の植物では、該ムギネ酸類縁化合物を生合成し、これらを根から根圏土壌に分泌することによって、不溶化鉄をム

ギネ酸錯体の形で可溶化し、この鉄錯体を直接根から吸収することができる。適宜従って、本発明タンパク質を前述の植物で大量発現させることによってムギネ酸類縁化合物の生成を増強し、不溶化鉄の吸収能力を向上させることが可能となる。

ニコチアナミンアミノ基転移酵素活性は、例えば、Kanazawa K. et al., Journal of Experimental Botany, 45, 1903-1906 (1994)などに記載される方法で測定できる。具体的には、酵素溶液に基質であるニコチアナミンと2-オキシグルタル酸、ならびに補酵素であるピリドキサルリン酸を添加し25℃で30分間反応させる。反応後、 NaBH_3 を添加して反応生成物を還元し、HPLCでデオキシムギネ酸を定量する。

【0006】

本発明遺伝子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子であり、例えば、オオムギ(*Hordeum vulgare*)などのイネ科植物から、例えば、後述のような方法により調製することができる。具体的な塩基配列としては、例えば、配列番号2で示される塩基配列(CDSの存在位置62~1444)を有する遺伝子等をあげることができる。

本発明遺伝子を、ムギネ酸類を利用して鉄を吸収している植物に導入し、得られた形質転換植物でムギネ酸類の生合成能力を高めることによって、根圏土壌中の不溶化鉄の吸収能力を増強し、鉄欠乏耐性を向上させることができる。

尚、本発明遺伝子は、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むものであり、例えば、ストリンジェントな条件でハイブリダイズすることによって特定される遺伝子も含んでいる。ここで言うストリンジェントな条件とは、例えば、実施例4に記載したcDNAライブラリーのスクリーニングの際に用いる条件を意味する。

【0007】

本発明タンパク質をオオムギ(*Hordeum vulgare*)などのイネ科植物から調製するには、例えば、鉄欠乏処理したオオムギなどのイネ科植物の全根を磨碎して得られる抽出液を、疎水性相互作用クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、そして再度、吸着クロマトグラフィーの順に供することによって本発明タンパク質をその活性を指標に部分精製する。この2回目の吸着クロマトグラフィーで得られたタンパク質画分を画分ごとに二次元電気泳動に供して、各画分のニコチアナミンアミノ基転移酵素活性の強度に比例して消長するタンパク質スポットを検出する。検出されたスポットが本発明タンパク質であり、二次元電気泳動ゲルから分取することにより、本発明タンパク質を精製できる。

【0008】

本発明遺伝子を調製するには、例えば、本発明タンパク質を部分分解して得られるペプチド断片のアミノ酸配列および本発明タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサーによって決定する。このアミノ酸配列から予想されるDNA配列からなるプライマーを2つ以上合成し、鉄欠乏処理をしたオオムギなどのイネ科植物の根から調製したmRNAから逆転写酵素によって合成したcDNAをテンプレートにしてPCRを行うと、本発明遺伝子のcDNA断片が増幅される。この増幅されたcDNA断片をプローブとして用いて、以下に述べるcDNAライブラリーのスクリーニングを行う。鉄欠乏処理をしたオオムギなどのイネ科植物の根からmRNAを調製し逆転写酵素によってcDNAを合成し、これをラムダZAPIIなどのファージベクターまたはpUCなどのプラスミドベクターへ組み込んだcDNAライブラリーを作製する。このライブラリーを先に述べたプローブでスクリーニングし、ニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子のcDNAを選抜する。選抜したcDNAの塩基配列を決定することによって、選抜したcDNAがニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子(本発明遺伝子のcDNA)であることを確認することができる。

【0009】

このようにして選抜されたcDNAを用いてゲノムDNAを取得しその塩基配列を決定するには、例えば、葉部、茎部、根部などの植物組織を液体窒素で瞬時に凍結した後、乳鉢と乳棒あるいはワーリングブレンダーなどを用いて十分に磨碎して

得られた磨砕物から、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシーケンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989)などに記載の通常の方法に準じて、ゲノムDNAを抽出する。得られたゲノムDNAを適当な制限酵素で切断した後、得られたゲノムDNA断片をシヨ糖密度勾配遠心法や塩化セシウム平衡遠心法などの公知の方法で分画する。分画された各ゲノムDNA断片画分について、選抜されたcDNA(本発明遺伝子のcDNA)をプローブとした通常のサザンハイブリダイゼーション法を行い、目的とする遺伝子を含むゲノムDNA断片画分を決定する。さらに、このゲノムDNA断片画分を、市販のプラスミド、ファージ、コスミドなどの適当なベクターにライゲーションすることによりゲノムDNAライブラリーを作製する。このライブラリーに対して、本発明遺伝子のcDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションによる通常のスクリーニングを行い、本発明タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むゲノムDNAクローンを取得する。得られたDNAクローンは遺伝子配列の解析に適当なベクター、例えば、プラスミドなどにサブクローニングした後、通常の方法に準じて塩基配列を解析することにより、本発明タンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むゲノムDNA塩基配列を決定することが出来る。

【0010】

さらに、Bina-Stem, Met et al. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 731(1979) や Sollner-Webb and Reeder, R.H., Cell, 18, 485(1979)などに記載されるプライマーエクステンション法あるいはBerk, A.J. and Sharp, P.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1274(1978)などに記載されるS1マッピング法等により、本発明遺伝子のゲノムDNAの転写開始点を決定することができる。このようにして決定された転写開始点の上流には、転写開始に必要なTATA配列が存在する。通常この転写点の上流1 kbから約10 kbに遺伝子発現の制御を担うプロモーター配列がある。本発明遺伝子のプロモーター部位は、例えば、あらかじめ様々な長さのプロモーター領域を有する遺伝子断片をGUS等のレポーター遺伝子に接続し、これを導入したトランスジェニック植物を作製し、作製された植物の各組織におけるレポーター遺伝子の発現の有無を調べることによって最終的に決定することが出来る。一方、ターミネーター配列は、終始コドンの下流の3'末端非翻訳領域

に存在するpoly(A)付加シグナル(AATAAAをコンセンサス配列とする)のさらに下流に通常存在するpolyA配列に相当するゲノムDNA領域に存在し、効率的な転写終結の機能を有している。

【0011】

本発明プラスミドは、配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを特徴とするプラスミドである。好ましい具体的なプラスミドとしては、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子をpSK-(Strategene)にクローニングし作製したプラスミドがあり、ベクター部分が小さく、大腸菌でコピー数が多いという特徴を有しており、DNA調製やDNA構造解析を行うのに適している。

【0012】

ところで、ムギネ酸類を利用して鉄を吸収している植物では、ニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子の発現は鉄欠乏状態で強く誘導される。通常の土壌(畑土壌)は酸化的条件下にあり、土壌溶液中の3価鉄濃度は植物が要求する $10^{-4} \sim 10^{-8} \text{M}$ をはるかに下回る濃度でしか存在しないため、ニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子およびムギネ酸生合成系の遺伝子が常に誘導されている。即ち、ムギネ酸類を恒常的に生合成し、根から根圏土壌に分泌することによって、積極的に土壌中の不溶化鉄を吸収している。

本発明プラスミドを何らかの大腸菌などの微生物である宿主細胞に導入し、宿主細胞内で高発現させることによってこの宿主細胞から大量の本発明タンパク質を容易に単離することができる。この大量に調製された本発明タンパク質を利用して、ニコチアナミンアミノ基転移酵素の阻害剤のスクリーニングシステムを構築することができる。例えば前述のニコチアナミンアミノ基転移酵素の活性測定法に準じて、調製された酵素溶液に基質であるニコチアナミンと2-オキシグルタル酸、補酵素であるピリドキサルリン酸、及び阻害剤の候補化合物を添加し25℃で30分間反応させる。反応後、 NaBH_3 を添加して反応生成物を還元しHPLCで

デオキシムギネ酸を定量することによってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性が認められない化合物を選抜する。このスクリーニングシステムによって選抜されたニコチアナミンアミノ基転移酵素の阻害剤は、ムギネ酸類縁化合物を利用して鉄を吸収している植物に対する選択的な除草剤として有用な化合物となりうる。

【0013】

本発明発現プラスミドは、(1)植物細胞内で機能可能なプロモーター、(2)配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質をコードすることを特徴とする遺伝子及び(3)植物細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させることにより構築することが出来る。

ここで、「機能可能な形で」とは、構築されたプラスミドを宿主細胞内に導入し形質転換させた場合に、該宿主細胞内で本発明タンパク質を発現させる機能を有するように、プロモーターの制御下に目的とする遺伝子を組み込んだ状態になることを意味するものである。

植物細胞内で機能可能なプロモーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS))プロモーターなどのT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の19Sおよび35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein(PR)遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることが出来る。さらに、これに限定されない公知の植物プロモーターもあげられる。

また、植物細胞内で機能可能なターミネーターとしては、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーターなどのT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニクウイルスGV1, GV2のターミネーターなどの植物ウイルス由来のターミネーターなどをあげることが出来る。さらに、これに限定されない公知の植物ターミネーターもあげられる。

【0014】

このようなプラスミド(本発明(発現)プラスミド)を宿主細胞内に導入することにより該宿主細胞を形質転換する。例えば、宿主細胞が植物の場合、本発明(発現)プラスミドをアグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、または、パーティクルガン方法(特開平5-508316および特開昭63-258525)などの公知の手段により植物内に導入し、本発明遺伝子が導入された植物を選抜することによって形質転換植物細胞を得ることが出来る。得られた形質転換植物細胞から、例えば、内宮博文著、植物遺伝子操作マニュアル(トランスジェニック植物の作り方)1990年、講談社サイエンティフィック((ISBN4-06-153515-7 C3045)、27-55頁などに記載の通常の植物細胞培養方法により植物体を再生することによって形質転換された植物体を得る。

【0015】

さらに本発明は、(1)宿主細胞内で機能可能なプロモーター(2)ニコチアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子及び(3)宿主細胞内で機能可能なターミネーターを機能可能な形で前記の順序に結合させることを特徴とする発現プラスミドを宿主細胞に導入し、該宿主細胞を形質転換させることにより形質転換体の鉄吸収能力を増強する方法を提供する。

宿主細胞内で機能可能なプロモーターとしては、例えば、大腸菌のラクトースオペロンのlacZ遺伝子プロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(ADH)プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート(Ad.ML)プロモーター、SV40の初期プロモーターおよびバキュロウイルスプロモーターなどをあげられる。宿主細胞が植物である場合には、前述の様な植物細胞内で機能可能なプロモーターなどがあげられる。

また、宿主細胞内で機能可能なターミネーターとしては、例えば、酵母のHIS Terminator sequence、ADH1ターミネーター、SV40のearly splicing regionなどをあげることが出来る。宿主細胞が植物である場合には、前述の様な植物細胞内で機能可能なターミネーターなどがあげられる。

ニコチアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子としては、例えば、植物由来のニコ

チアナミンアミノ基転移酵素の遺伝子であり、より好ましくは本発明遺伝子をあげることができる。

【0016】

本発明遺伝子断片は、本発明遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片をいい、配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片や、配列番号2で示される塩基配列を有する遺伝子の部分塩基配列を有する遺伝子断片等であり、具体的には、例えば、配列番号3に示される遺伝子断片等を挙げることができる。

これら遺伝子断片はハイブリダイゼーション法におけるプローブやPCR法におけるプライマーとして有用である。特に、PCR法におけるプライマーとしては、塩基数が15以上50以下である遺伝子断片が好ましい。

【0017】

本発明検出方法は、本発明遺伝子断片をプローブとして用いて、植物遺伝子断片からハイブリダイゼーション法によってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を検出する方法である。

【0018】

具体的には、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される方法に準じて行うことができる。尚、ここで用いられる遺伝子断片としては、例えば、目的の植物のcDNAライブラリーやゲノムDNAライブラリー等を挙げることができる。該植物遺伝子断片は、市販の植物由来のライブラリーをそのまま用いることもできるし、また、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に準じて作製されたライブラ

リーも用いることができる。

尚、本発明検出法によりニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製することによってニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子を取得することもできる。

【0019】

さらに、本発明検出方法を植物の解析に利用してもよい。具体的には特定の植物種の異なる品種から植物ゲノムDNAを、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシーケンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989)などに記載の通常の方法に準じて調製し、適当な少なくとも数種類の制限酵素で切断し電気泳動した後、通常の方法に従ってプロッティングしたフィルターを作製する。このフィルターに通常の方法で調製されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、プローブがハイブリダイズするDNA断片の長さの違いから品種間のムギネ酸生合成に伴う表現形質の差を解析する。また、この方法により特定の植物と同種の非遺伝子組換え植物とで比較したときに非遺伝子組換え植物よりもハイブリダイズするバンドの数が多く検出された場合、該植物が遺伝子組換え植物であると判別できる。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN 4-87962-144-7、90-94頁に記載されるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法に準じて行くとよい。

【0020】

また、本発明増幅方法は、本発明遺伝子断片をプライマーとして用いて、植物遺伝子断片に対してPCR (Polymerase chain reaction) を行うことによってニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を増幅させる方法である。具体的には、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7等に記載される方法に準じて行うことができる。

尚、本発明増幅方法によりニコチアナミンアミノ基転移酵素遺伝子又はその遺伝子断片を特定し、特定された前記遺伝子又はその遺伝子断片を単離・精製するこ

とにより取得することもできる。

【0021】

さらに、本発明増幅方法を植物遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、例えば、特定の植物種から調製した植物ゲノムDNAを鋳型として、本発明遺伝子断片をプライマーとして用いるPCRを行い、本発明遺伝子の一部又は全体を増幅させる。得られたPCR産物をホルムアルデヒド溶液と混合し、85℃で5分間加熱変性処理を行った後氷上で急冷する。このサンプルを、グリセロールを0%または10%の濃度で含む、例えば、6%アクリルアミドゲルで電気泳動を行う。この電気泳動には市販のSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)用の電気泳動装置を用い、例えば、5℃、25℃、37℃などにゲルの温度を一定に保って電気泳動を行う。電気泳動したゲルは、例えば、市販の試薬による銀染色法等の方法でDNAを検出する。

検出されたDNA断片の電気泳動度の差から本発明遺伝子内の変異に基づく品種間のムギネ酸生合成に伴う表現形質の差を解析する。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコール」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、141-146頁等に記載される方法に準じて行うとよい。

【0022】

【実施例】

以下、実施例により詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0023】

実施例1 (本発明タンパク質の単離方法)

鉄欠乏処理したオオムギの根150gを抽出緩衝液(0.2M Tris-HCl, 10mM EDTA, 0.1mM p-APMSF, 10mM DTT, 5% グリセロール, 5% ポリビニルピロリドン, pH8.0)中で磨砕し、この磨砕物を8,000 x gで30分間遠心分離して上清を分離した。得られた上清に30%飽和になるように硫酸アンモニウム(以下、硫安と記す)を加え、該試料を30%飽和硫安緩衝液((50mM Tris-HCl(pH8.0), 5mM EDTA, 10mM DTT)で平衡化したButyl Toyopearl 650M(TOSO製)に供し、同緩衝液で洗浄後、15%飽和硫安緩衝液で溶出した。この溶出画分に終濃度で0.1mMのp-APMSFを加え、0.1M K

Cl, 50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH6.8), 10mM DTTで一晩透析した後、該試料を同緩衝液で平衡化したHydroxylapatite(100-350メッシュ、ナカライ製)に供した。同緩衝液で洗浄後、0.5M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH6.8), 10mM DTTで溶出した。この溶出面分をモルカット(MILLIPORE, 分画分子量10,000)を用いて20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM KCl, 10mM DTTに緩衝液を交換し、同緩衝液で平衡化したDEAE Sephasel(ファルマシア製)に供した。同緩衝液で洗浄後、10mM~500mM KClの濃度勾配溶出を行った。このDEAE Sephaselの素通り面分をモルカットを用いて20mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM KCl, 5mM EDTA, 1mM DTTに緩衝液を交換し、EAB-Sepharose 4B(ファルマシア製)にニコチアナミン(NA)を結合したNA-Sepharose 4Bに供した。同緩衝液で洗浄後、1mM NA, 10mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH6.0)で溶出した。この溶出面分を二次元電気泳動し、NA-Sepharose 4Bカラムに供する前に比べて非常に濃縮されているスポットを検出した。これが本発明タンパク質であり、このスポットを分取することによって本発明タンパク質を単離した。

この分取した本発明タンパク質のN末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー(Applied Biosystems製)で解析した。さらに、1%臭化シアンを含む70%ギ酸溶液で処理して生じたペプチド断片の3つについてもN末端アミノ酸配列を同様に解析した。

【0024】

実施例2 (本発明タンパク質のcDNAクローニング用のプローブの作製)

鉄欠乏処理したオオムギの根6gより渡辺格監修、杉浦昌弘編集:「クローニングとシーケンス(植物バイオテクノロジー実験マニュアル)」、農村文化社、東京(1989) 34-40頁に記載のSDS-Phenol法で全RNA255 μg を回収した。回収された全RNAのうち75 μg を取り、DYNABEADS mRNA Purification Kit (DYNAL製)を用いてPoly(A)+RNAを調製した。調製されたPoly(A)+RNAを、dT17アダプタープライマー(5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')を用いて逆転写しcDNAを調製した。調製されたcDNAの一部を用いて、2段階のPCRによって本発明遺伝子のcDNA断片を増幅した。1回目の反応は、本発明タンパク質のN末端アミノ酸配列に基づいて合成したプライマー1(5'-GCIGTIGARTGGAAYTTYGCIMG-3')と前述のdT17アダプタープライマーを用いて、得られたcDNAをテンプレートにして、94°C(40秒間)、

40℃ (1分間)、72℃ (2分間)を25サイクル、94℃ (40秒間)、45℃ (1分間)、72℃ (2分間)を25サイクルでPCRを行った。このPCRの反応液をテンプレートにして、前述の1%臭化シアンを含む70%ギ酸溶液で処理して生じたペプチド断片のN末端アミノ酸配列を基に合成したプライマー2(5'-GCDATRTGICCRAAIACICC-3')とプライマー1を用いて2回目のPCRを94℃ (40秒間)、45℃ (1分間)、72℃ (2分間)を40サイクル行った。この2回目のPCRで増幅した約600bpのDNA断片を0.8%アガロース電気泳動のゲルから切り出して精製し、cDNAライブラリーをスクリーニングするためのプローブとした。

【0025】

実施例3 (鉄欠乏処理したオオムギ根からのcDNAライブラリーの作製)

実施例2記載の鉄欠乏処理したオオムギの根から調製したPoly(A)+RNA5 μ gから市販のcDNA合成キット(SUPER SCRIPTTM Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning, GIBCO BRL製)を用いてcDNA合成を行い、SalIアダプターを結合させた後、NotIで切断しcDNAを回収した。

cDNAライブラリー用のベクター(以下、pYH23と記す。)は、R.Daniel Gietz and Akio Sugino, Gene.74 (1988) 527-534 に記載される酵母のマルチコピープラスミドYEplac181に修飾を加えて作製した。具体的には、YEplac181のマルチクロニング部位のHindIIIおよびBamHIからEcoRI切断部位までを削除した。さらに、SphI認識部位にpTV-100由来のアルコールデヒドロゲナーゼのプロモーターとターミネーター配列をサブクロニングし、この断片のBamHI認識部位にNotIリンカーを挿入した。

このようにして作製したpYH23をNotIとXhoIで消化し、先に調製したcDNAを挿入した後、これを大腸菌XL1-Blue株に形質転換し、30万個の独立したコロニーに由来するcDNAライブラリーを作製した。

【0026】

実施例4 (本発明酵素のcDNAクローンのスクリーニング)

実施例3で作製されたプローブを市販の放射性標識キット(Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2, TaKaRa)を用いて放射性標識し、本発明タンパク質のcDNAクローニング用プローブDNAを調製した。実施例3で調製された鉄欠乏処理したオオムギの根由来のcDNAライブラリーのプラスミドDNAを持つ大腸菌を、LB培地にまいて37℃で10時間培養した後、市販のナイロンメンブレン(HybondTM-N+, Amersham Life Science)に移し取り、このメンブレンを10%SDSで3分間、アルカリ変性液(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)で5分間、中和液(0.5M Tris/HCl (pH7.0), 1.5M NaCl)で3分間、2XSSPE(20mM リン酸緩衝液(pH7.4), 0.3M NaCl, 5mM EDTA)で3分間を2回処理し乾燥後、3分間紫外線を照射しDNAをメンブレン上に不可逆的に固定した。プレハイブリダイゼーション溶液(5XDenhart's溶液, 5XSSPE, 0.1% SDS, 100 μ g/ml 変性したサケ精巢DNA)を用いて65℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーション溶液(5XDenhart's溶液, 5XSSPE, 0.1% SDS)に放射性標識したプローブを加えた溶液中65℃で12時間ハイブリダイゼーション

ンを行った。その後、メンブレンを6XSSPを用いて65℃で10分間1回、2XSSP, 0.1% SDSを用いて42℃で10分間2回洗浄し、Fuji Medical Xray Filmに感光させて陽性コロニーを検出した。同様に2次および3次スクリーニングを行い、本発明タンパク質のcDNAクローンを単離した。

【0027】

実施例5 (本発明タンパク質をコードするcDNAの塩基配列とアミノ酸配列の決定)

実施例4で単離された本発明タンパク質のcDNAクローンは、J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis著:「Molecular Cloning Second Edition」、Cold Spring Harbor Press(1989)に記載されている通常の方法によってプラスミドベクター pBluescript SK(-)にサブクローニングし、プラスミドcDNAクローンを得た。そして該cDNAクローンのインサートの塩基配列を、(1) Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems製)を用いてApplied Biosystems製の373A DNA Sequencerによって、2) Thermo Sequence Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham LIFE SCIENCE製)を用いて、DSQ-1000L DNA Sequencer (島津製)によって、又は(3) BcaBESTTM Dideoxy Sequencing Kit (TaKaRa製)を用いてBAS-2000 (富士フイルム製)によって決定した。その塩基配列(配列番号2参照)から該蛋白質の全アミノ酸配列を決定した(配列番号1参照)。本発明タンパク質は461個のアミノ酸からなり、分子量は49564.15と計算された。

【0028】

【発明の効果】

本発明により、新規のニコチアナミンアミノ基転移酵素およびその遺伝子等の提供を可能にした。

【0029】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：461

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

-30	-25	-20
Met Val His Gln Ser Asn Gly His Gly Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala		
-15	-10	-5
Asn Gly Lys Ser Asn Gly His Ala Ala Ala Ala Asn Gly Lys Ser Asn		
1	5	10
Gly His Ala Ala Ala Ala Ala Val Glu Trp Asn Phe Ala Arg Gly Lys		
20	25	30
Asp Gly Ile Leu Ala Thr Thr Gly Ala Lys Asn Ser Ile Arg Ala Ile		
35	40	45
Arg Tyr Lys Ile Ser Ala Ser Val Glu Glu Ser Gly Pro Arg Pro Val		
50	55	60
Leu Pro Leu Ala His Gly Asp Pro Ser Val Phe Pro Ala Phe Arg Thr		
65	70	75
Ala Val Glu Ala Glu Asp Ala Val Ala Ala Ala Leu Arg Thr Gly Gln		
85	90	95
Phe Asn Cys Tyr Ala Ala Gly Val Gly Leu Pro Ala Ala Arg Ser Ala		
100	105	110
Val Ala Glu His Leu Ser Gln Gly Val Pro Tyr Lys Leu Ser Ala Asp		
115	120	125
Asp Val Phe Leu Thr Ala Gly Gly Thr Gln Ala Ile Glu Val Ile Ile		
130	135	140

Pr	Val	Leu	Ala	Gln	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn	Ile	Leu	Leu	Pro	Arg	Pro
145					150					155					160
Gly	Tyr	Pro	Asn	Tyr	Glu	Ala	Arg	Ala	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Glu	Val
			165						170					175	
Arg	His	Phe	Asp	Leu	Ile	Pro	Asp	Lys	Gly	Trp	Glu	Ile	Asp	Ile	Asp
			180						185					190	
Ser	Leu	Glu	Ser	Ile	Ala	Asp	Lys	Asn	Thr	Thr	Ala	Met	Val	Ile	Ile
		195						200					205		
Asn	Pro	Asn	Asn	Pro	Cys	Gly	Ser	Val	Tyr	Ser	Tyr	Asp	His	Leu	Ala
		210					215					220			
Lys	Val	Ala	Glu	Val	Ala	Arg	Lys	Leu	Gly	Ile	Leu	Val	Ile	Ala	Asp
225					230					235				240	
Glu	Val	Tyr	Gly	Lys	Leu	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	Pro	Phe	Ile	Pro	Met
			245						250					255	
Gly	Val	Phe	Gly	His	Ile	Ala	Pro	Val	Leu	Ser	Ile	Gly	Ser	Leu	Ser
			260						265					270	
Lys	Ser	Trp	Ile	Val	Pro	Gly	Trp	Arg	Leu	Gly	Trp	Val	Ala	Val	Tyr
		275						280						285	
Asp	Pro	Thr	Lys	Ile	Leu	Glu	Lys	Thr	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Ile	Thr
		290						295						300	
Asn	Tyr	Leu	Asn	Val	Ser	Thr	Asp	Pro	Ala	Thr	Phe	Val	Gln	Glu	Ala
305					310						315			320	
Leu	Pro	Lys	Ile	Leu	Glu	Asn	Thr	Lys	Ala	Asp	Phe	Phe	Lys	Arg	Ile
			325						330					335	
Ile	Gly	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Ser	Glu	Ile	Cys	Tyr	Arg	Glu	Ile	Lys
			340						345					350	
Glu	Asn	Lys	Tyr	Ile	Thr	Cys	Pro	His	Lys	Pro	Glu	Gly	Ser	Met	Phe
		355							360					365	
Val	Met	Val	Lys	Leu	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	His	Asp	Asp

370	375	380
Ile Asp Phe Cys Cys Lys Leu Ala Lys Glu Glu Ser Val Ile Leu Cys		
385	390	395
Pro Gly Ser Val Leu Gly Met Glu Asn Trp Val Arg Ile Thr Phe Ala		
405	410	415
Cys Val Pro Ser Ser Leu Gln Asp Gly Leu Glu Arg Val Lys Ser Phe		
420	425	429
Cys Gln Arg Asn Lys Lys Lys Asn Ser Ile Asn Gly Cys		

【0030】

配列番号：2

配列の長さ：1660

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

配列の種類：cDNA

配列

ATTGACTAGC TAGTTCATTC CCTGCCACAC TGCTAGTACT CCTCCTCGTT TCCTCGTGGC	60
A ATG GTA CAC CAG AGC AAC GGC CAC GGC GAG GCC GCC GCC GCC GCC	106
GCC AAC GGC AAG AGC AAC GGG CAC GCC GCC GCC GCG AAC GGC AAG AGC	154
AAC GGG CAC GCG GCG GCG GCG GCG GTG GAG TGG AAT TTC GCC CGG GGC	202
AAG GAC GGC ATC CTG GCG ACG ACG GGG GCG AAG AAC AGC ATC CGG GCG	250
ATA CGG TAC AAG ATC AGC GCG AGC GTG GAG GAG AGC GGG CCG CGG CCC	298
GTG CTG CCG CTG GCC CAC GGT GAC CCG TCC GTG TTC CCG GCC TTC CGC	346
ACG GCC GTC GAG GCC GAA GAC GCC GTC GCC GCC GCG CTG CGC ACC GGC	394
CAG TTC AAC TGC TAC GCC GCC GGC GTC GGC CTC CCC GCC GCA CGA AGC	442
GCC GTA GCA GAG CAC TTG TCA CAG GGC GTG CCC TAC AAG CTA TCG GCC	490
GAC GAC GTC TTC CTC ACC GCC GGC GGA ACT CAG GCG ATC GAA GTC ATA	538
ATC CCG GTG CTG GCC CAG ACT GCC GGC GCC AAC ATA CTG CTT CCC CGG	586
CCA GGC TAT CCA AAT TAC GAG GCG CGA GCG GCA TTC AAC AAG CTG GAG	634
GTC CGG CAC TTC GAC CTC ATC CCC GAC AAG GGG TGG GAG ATC GAC ATC	682

GAC TCG CTG GAA TCC ATC GCC GAC AAG AAC ACC ACC GCG ATG GTC ATC	730
ATA AAC CCA AAC AAT CCG TGC GGC AGC GTT TAC TCC TAC GAC CAT CTG	778
GCC AAG GTC GCG GAG GTG GCA AGG AAG CTC GGA ATA TTG GTG ATC GCT	826
GAC GAG GTT TAC GGC AAA CTG GTT CTG GGC AGC GCC CCG TTT ATC CCG	874
ATG GGC GTC TTT GGG CAC ATT GCC CCG GTC TTG TCC ATT GGA TCT CTG	922
TCC AAG TCG TGG ATA GTG CCT GGA TGG CGA CTT GGA TGG GTG GCG GTG	970
TAC GAC CCC ACA AAG ATT TTA GAG AAA ACT AAG ATC TCT ACG TCT ATT	1018
ACG AAT TAC CTT AAT GTC TCA ACG GAC CCA GCA ACC TTC GTT CAG GAA	1066
GCT CTT CCT AAA ATT CTT GAG AAC ACA AAA GCA GAT TTC TTT AAG AGG	1114
ATT ATT GGT CTA CTA AAG GAA TCA TCA GAG ATA TGT TAT AGG GAA ATA	1162
AAG GAA AAC AAA TAT ATT ACG TGT CCT CAC AAG CCA GAA GGA TCG ATG	1210
TTT GTA ATG GTC AAA CTA AAC TTA CAT CTT TTG GAG GAG ATC CAT GAC	1258
GAC ATA GAT TTT TGC TGC AAG CTC GCA AAG GAA GAA TCA GTA ATT TTA	1306
TGT CCA GGG AGT GTT CTT GGA ATG GAA AAT TGG GTC CGT ATT ACT TTT	1354
GCC TGC GTT CCA TCT TCT CTT CAA GAT GGA CTC GAA AGG GTC AAA TCA	1402
TTC TGT CAA AGG AAC AAG AAG AAG AAT TCT ATA AAT GGT TGT TAG	1447
TTGTACACAC CCCTAGTTGT ACATCTGACT GAAGCTGTAA ATCATTCTTA GTTATCCCCC	1507
ATTTATATAT TTCAATAAAA CATATTGTAA TGGTTCTGTT GTAGCTGTCC AAGTCATGTA	1567
CTCTACTTTT TGATGTATTT GGCCTCATTG CCTTGCATCA ATTTCAATAA AAATGGTTGT	1627
GTACACCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA	1660

【0031】

配列番号：3

プライマー1 5'-GCIGTIGARTGGAAYTTYGCIMG-3'

プライマー2 5'-GCDATRTGICCRAAIACICC-3'

尚、R、Y、M、Dは以下の混合塩基を示し、Iはイノシンを示している。

R = A/G, Y = C/T, M = A/C, D = A/T/G

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 土壌中の不溶化鉄の吸収能力を増強し、鉄欠乏耐性を向上させる技術を提供する。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつニコチアナミンアミノ基転移酵素活性を有することを特徴とするタンパク質、その遺伝子およびその利用。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000002093
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100093285
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内
【氏名又は名称】 久保山 隆
【選任した代理人】
【識別番号】 100094477
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内
【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社